

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000428

致感染性心内膜炎长奈瑟菌的鉴定和临床分析

张利军, 张秀瑜, 瞿渝佳, 王云英

(重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010)

【摘要】目的:鉴定从心内膜炎患者血液中分离出病原菌的生物学性状并鉴定至亚种,并初步探索其引起心内膜炎的机制。**方法:**按常规鉴定方法进行细菌表型特征的鉴定,16 S rRNA 分子生物学方法鉴定,微量生化管分型,体外建立细菌生物膜。**结果:**常规细菌学与 16 S rRNA 分子生物学方法鉴定为长奈瑟菌,微量生化管分型为硝酸盐还原亚种,此菌在体外能形成成熟的生物膜。**结论:**国内首次发现长奈瑟菌引起的心内膜炎,并且此菌易与其它细菌相混淆。临床微生物工作者应加强对长奈瑟菌引起感染性心内膜炎的认识,并提高对该菌鉴定的准确性。

【关键词】长奈瑟菌;心内膜炎;细菌生物膜**【中国分类号】**R446.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-04-04Identification and clinical significance of *Neisseria elongata* isolated from endocarditis

Zhang Lijun, Zhang Xiuyu, Qu Yujia, Wang Yunying

(Department of Laboratory Medicine, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To characterize the biological properties of a pathogenic bacteria separated from blood sample from a patient with endocarditis, and then to investigate the pathogenesis preliminarily. **Methods:** Isolates were initially identified by standard biochemical tests including micro biochemical tubes. The bacterial 16 S ribosomal RNA gene (16 S rRNA) was sequenced for molecular biological identification. Biofilms of the isolates were formed *in vitro* by standard methods. **Results:** The phenotypic and genotypic results of the isolate were corresponded well with those of *Neisseria elongata* spp. *nitroreducens*. *In vitro* model exhibited the ability of isolates to develop mature biofilms. **Conclusion:** The reported first case of endocarditis due to *Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens* in China may attract the attention of clinical microbiologist in identifying this organism.

【Key words】*Neisseria elongata*; endocarditis; biofilms

长奈瑟菌(*N.elongata*)属于奈瑟菌属,大多数奈瑟菌为革兰阴性双球菌,而长奈瑟菌为革兰阴性球杆菌^[1-2]。在欧美国家曾少量报道其引起感染性心内膜炎^[3],在我国尚未见报道。本文对这株从血液及骨髓中分离、引起感染性心内膜炎的长奈瑟菌,进行常规细菌学与 16S rRNA 分子生物学方法鉴定与分型并结合临床情况进行分析,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 病例资料

患者:女性,21岁,因“发热 32 d”入院。患者于 32 d 前无明显诱因出现发热,发热前有畏寒、寒战,体温 39℃,伴全身酸痛,乏力。在当地诊所使用退热药物和抗菌素治疗,有所好转;但 1 d 后再次出现发热,在当地诊所给予病毒灵、林可霉素和柴胡治疗体温可下降,但仍反复发热,体温 38℃~39℃。入院 2 d 前再次发热,体温高达 40℃,故来我院治疗。患者发病前并无手术及外伤史,也否认牙科操作史。入院前在当地医院检查发现白细胞及中性粒细胞升高,血培养阴性,心脏彩超未见异常。入院后查体:体温 37.4℃,脉搏 96 次/min,呼吸 14 次/min,血压 122/78 mmHg。心脏听诊发现奔马律,余无异常,患者亦无自觉症状。血常规检查:白细胞 7.71×10^9 个/L,中性粒细胞百分比为 75.5%,C-反应蛋白 69.7 mg/L(参考范围 <10 mg/L)。心肌酶谱除超敏 C-反应蛋白升高外均正常。

作者介绍:张利军 Email:zhanglijuncqmu@hotmail.com,

研究方向:临床微生物诊断学。

通信作者:王云英,Email:yuzhihang1118@sina.com。

基金项目:重庆市卫生局医学科学技术研究资助项目(编号:2011-2-157)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150127.1517.021.html (2014-10-30)

行骨髓培养,间隔 1 h 分别采集 2 套外周血送培养,18 h 后血培养和骨髓培养需氧培养报阳,涂片染色可见革兰阴性球杆菌,经培养鉴定后确认为长奈瑟菌。入院后于我院行心脏彩超,发现二尖瓣前叶赘生物形成,二尖瓣前叶瓣根部穿孔伴中度反流,左室饱满,心内膜炎的诊断明确。静脉滴注第 4 代喹诺酮类药物发热迅速得到控制。

1.2 细菌培养与鉴定

采集患者的血液和骨髓注入需氧及厌氧血培养瓶,行全自动培养监测。待血培养仪报阳后转种到血平板和巧克力平板,35℃,5% CO₂ 环境培养。取纯培养的菌落革兰染色镜检后分别作触酶和氧化酶试验,并接种葡萄糖、硝酸盐微量生化管进行分型试验。使用 VITEK2-Compact 和 VITEK MS 鉴定,ATB ANA 药敏板进行药敏试验。

1.3 分子生物学方法鉴定

采用 16S rRNA 序列分析法,参照文献[4]合成细菌 16S rRNA 基因引物,上游引物,5'-TGCCAGCAGCCGCGTAAT-AC-3',下游引物,P2 5'-CGCTCGTTGCGGGACTTAACC-3',目的片段约为 590 bp 大小的保守的 16S rRNA 序列。PCR 反应体系 20 μl:2×Taq PCR MasterMix 10 μl,上下游引物各 1 μmol/L,模板约 50 ng,补足无酶水至 20 μl。PCR 反应条件:92℃预变性 2 min;95℃20 s,58℃20 s,72℃20 s 共 30 个循环;72℃延伸 10 min。反应结束后,取 2 μl 扩增产物,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的特异性,用数字凝胶成像系统记录实验结果。将 PCR 产物送北京华大生物工程有限公司测序。测序结果在 GenBank 数据库中用 BLAST 程序进行序列同源性比较。

1.4 体外生物膜的建立与鉴定

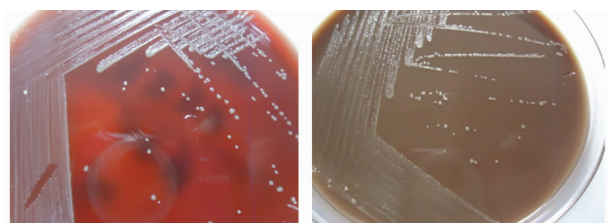
将厚 0.5 mm 的硅胶片分成长 3 mm、宽 2 mm 的小硅胶片,经环氧乙烷消毒备用。按照葛新等^[5]的方法建立生物膜,用无菌棉签挑选血平板上典型长奈瑟菌单个菌落到无菌生理盐水中,配制成 1 个麦氏浊度单位的菌悬液。在 24 孔板中,每孔加入 1 个麦氏单位菌悬液 200 μl、LB 肉汤培养液 800 μl、无菌硅胶片,充分震荡使硅胶片沉入 24 孔板底部。每天更换 LB 培养液,培养 5 d 后以结晶紫染色后在高倍镜下观察硅胶片上细菌生物膜的形成,同时将洗去浮游菌的硅晶片干燥固定后送重庆医科大学扫描电镜室成像。

2 结果

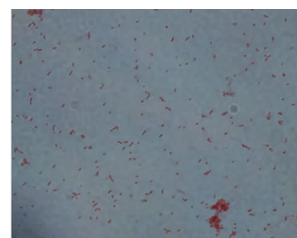
2.1 病原学检查

血液和骨髓标本在培养 18 h 后需氧瓶均报阳,涂片革兰染色发现革兰阴性球杆菌。将培养物转种到血平板和巧克力平板,35℃,5%CO₂ 环境培养,24 h 后在血平板和巧克力平板上可见 1~2 mm 淡黄色、半透明、光滑、黏稠的菌落。挑取单个菌落,涂片后革兰染色镜检明确为革兰阴性球杆状细菌,见图 1。经过 VITEK2-Compact 鉴定为长奈瑟菌,生物编码:1632000000,鉴定可信度 97%;质谱鉴定也为长奈瑟菌。该分离菌氧化酶阳性、触酶阴性,微量生化管发现该菌还原

硝酸盐,不发酵葡萄糖,鉴定为长奈瑟菌硝酸盐还原亚种。PCR 扩增该分离株的 16S rRNA 并对扩增产物进行 DNA 测序后在 GenBank 进行 BLAST 比对,结果显示片段长度为 551 bp,与长奈瑟菌硝酸盐还原亚种具有高度同源性,达 100%(NCBI Reference Sequence:NR_104944.1)。16S rRNA 序列分析结果和生化试验鉴定结果相同,进一步表明本次分离的菌株为长奈瑟菌硝酸盐还原亚种。



A. 血平板上分离的菌落形态 B. 巧克力平板上分离的菌落形态



C. 细菌革兰染色镜下形态

图 1 长奈瑟菌在不同培养基上的菌落形态及镜下形态

Fig.1 Morphology of *Neisseria elongata* on a different culture medium and Gram*stain

2.2 体外生物膜的形成

经过 5 d 培养,将硅胶片干燥固定后在电镜下成像,可见硅胶片上细菌呈团状聚集,彼此之间有较多纤维样物胶连,细菌呈立体分层不规则排列,形成成熟的生物膜,如图 2。

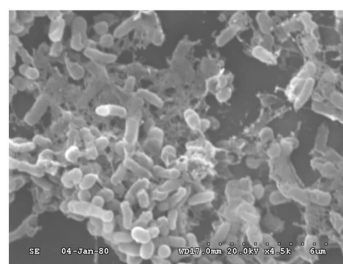


图 2 长奈瑟菌生物膜在激光共聚焦扫描电镜下的成像

Fig.2 Confocal laser scanning microscopy (CLSM) showing the biofilms of *Neisseria elongata*

3 讨论

长奈瑟菌属于奈瑟菌属,但是与大多数的奈瑟菌不同,更接近金氏杆菌和莫拉菌。大多数奈瑟菌为革兰阴性双球菌,而长奈瑟菌为革兰阴性球杆菌^[1-2],氧化酶阳性,触酶阴性(其他奈瑟菌包括长奈瑟菌

解糖亚种触酶阳性)。鉴于此菌特殊形态和生化反应,需要临床微生物工作者注意:此菌极易和一般阴性杆菌及金氏杆菌和莫拉菌相混淆,本分离菌株在血平板和巧克力平板上生长,而在麦康凯平板上不生长。长奈瑟菌与金氏杆菌在菌落、镜下形态极为相似:血琼脂平板上均形成淡黄色、半透明、光滑、黏稠的菌落,直径 1~2 mm,镜下均为革兰阴性球杆菌,成对或成短链。但金氏杆菌分解葡萄糖产酸,硝酸盐产气(+),而长奈瑟菌不分解葡萄糖产酸(解糖亚种除外),硝酸盐产气(-)。与莫拉菌相区别的是:莫拉菌触酶阳性,而长奈瑟菌触酶阴性。本次分离菌株按一般的革兰阴性杆菌和苛养菌在 VITEK-2 Compact 鉴定仪同时鉴定后,一般阴性杆菌鉴定为杀喹气单胞菌,鉴定可信度 98%;而苛养菌鉴定为长奈瑟菌,鉴定可信度 97%;同时将此菌送到外院用质谱鉴定,鉴定为长奈瑟菌。16 S rRNA 序列分析法也证实其为长奈瑟菌硝酸盐还原亚种。长奈瑟菌为专性需氧菌,它除了在形态上与其他奈瑟菌不同外,生化反应也不同,而且又易于其他的苛养菌相混淆,它的这些特点造成了对其鉴定的困难,很容易将其鉴定为其他细菌报告给临床。

通常认为长奈瑟菌寄居于人体咽部,属共生菌,包括 3 个经典亚种^[3]:长亚种、解糖亚种和硝酸盐还原亚种。亚种的鉴定主要通过生化实验:解糖亚种分解葡萄糖产酸,硝酸盐还原亚种硝酸盐还原实验阳性,而长亚种 2 个实验均阴性。从 20 世纪 70 年代起国外陆续报道长奈瑟菌引起心内膜炎病例,其中以硝酸盐还原亚种最多见,主要见于牙科术后及介入性心血管操作后,主要的并发症为栓塞、心肌局部脓肿及脑脓肿等。国外认为在抗生素杀灭细菌后应尽快进行手术治疗恢复心脏瓣膜功能。本病例属于国内首次报道,该病人在发病前并无相关危险因素暴露,院外血培养阴性可能与样本采集及该菌属苛养菌较难分离有关。入院时查体可闻及奔马律,心脏彩超也发现二尖瓣区赘生物生长,但由于病人个人原因,在症状缓解后即出院未行手术治疗。

采用有效的抗生素是治愈感染性心内膜炎的基础。由于长奈瑟菌感染导致的病例资料较少,目前美国临床实验室标准化委员会尚无推荐的药敏方法。本实验室采用 ATB ANA 药敏板测量其最小抑菌浓度,显示氨苄西林(1 $\mu\text{g/ml}$)、头孢噻肟(2 $\mu\text{g/ml}$)、氧氟沙星(1 $\mu\text{g/ml}$)、四环素(2 $\mu\text{g/ml}$)及氯霉素(2 $\mu\text{g/ml}$),头孢硝噻吩检测 β -内酰胺酶为阴性,因此临床使用莫西沙星静脉滴注,体温迅速恢复正

常。感染性心内膜炎指因病原微生物直接感染侵袭心内膜而产生心瓣膜或心室壁内膜的炎症,最常侵犯二尖瓣和主动脉瓣。在口腔局部手术、分娩及呼吸道感染等情况下,细菌进入血液。当细菌附着在已有病变的心脏瓣膜或心内膜时,菌体的特异黏附蛋白与宿主组织和细胞外基质结合,进而定植形成生物膜^[6];并且局部血小板、纤维蛋白原沉积,包绕细菌形成赘生物。感染性心内膜炎瓣膜中细菌生物膜的形成可引起瓣膜功能障碍、感染复发、长期慢性炎症反应、播散至身体其它部位及栓塞等,从而参与感染性心内膜炎的致病过程^[7-8]。

奈瑟菌属的细菌可以通过形成生物膜,从而逃避宿主免疫细胞的攻击,影响抗菌药物的疗效^[9]。本例病人体内的分离菌株在体外能形成成熟的生物膜,推测在体内也形成了生物膜。这可能是在院外使用抗生素后有时病情可好转,而有时又加重的原因。

综上所述,通过对该病例的报道和分析,希望能加深临床微生物工作者对长奈瑟菌引起感染性心内膜炎的认识,并提高对该菌鉴定的准确性。

参 考 文 献

- [1] Hofstad T, Hope O, Falsen E. Septicaemia with *Neisseria elongata* spp. nitroreducens in a patient with hypertrophic obstructive cardiomyopathy[J]. Scand J Infect Dis, 1998, 30(2): 200-201.
- [2] Simor AE, Salit IE. Endocarditis caused by the M6[J]. J Clin Microbiol, 1983, 17(5): 931-933.
- [3] Haddow LJ, Mulgrew C, Ansari A, et al. *Neisseria elongata* endocarditis: case report and literature review[J]. Clin Microbiol Infect, 2003, 9(5): 426-430.
- [4] Han XY, Pham AS, Tarrand JJ, et al. Rapid and accurate identification of mycobacteria by sequencing hypervariable regions of the 16S ribosomal RNA gene[J]. Am J Clin Pathol, 2002, 118(5): 796-801.
- [5] 葛新, 董小青, 张晓雷, 等. 3 种肺炎克雷伯菌生物膜制备方法的比较[J]. 中国感染与化疗杂志, 2006, 6(3): 193-194.
- [6] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases[J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(2): 95-108.
- [7] Hsiao JF, Lee MH, Chia JH, et al. *Neisseria elongata* endocarditis complicated by brain embolism and abscess[J]. J Med Microbiol, 2008, 57(3): 376-381.
- [8] Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis[J]. Annu Rev Microbiol, 2003(57): 677-701.
- [9] Kaplan JB, Fine DH. Biofilm dispersal of *Neisseria subflava* and other phylogenetically diverse oral bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(10): 4943-4950.

(责任编辑:关蕴良)